

T 细胞免疫反应抑制剂

技术领域

本发明涉及免疫学领域中一种抑制剂，特别涉及一种 T 细胞免疫反应抑制剂。

背景技术

机体的免疫系统始终处在一种复杂的调节过程中。免疫调节是指免疫应答过程中免疫系统内部各细胞之间、免疫细胞与免疫分子之间以及免疫系统与其他系统之间的相互作用，构成一个相互协调、相互制约的网络结构，使免疫应答维持合适的强度，从而保证机体内环境的稳定。在外来病原物入侵后，免疫系统可以根据病原物的特点激活需要的免疫反应来抵御和清除病原物。免疫反应又分为体液免疫反应和细胞免疫反应。其中体液免疫反应是产生特异性抗体的反应，而细胞免疫反应是激活 T 细胞为主的免疫反应。提高机体免疫力的最主要的手段是接种疫苗。目前已有多种方法用来生产抗传染性病原体的疫苗，如灭活疫苗，减毒活疫苗、重组疫苗，亚单位疫苗和 DNA 疫苗等，它们的基本作用原理是相同的，即借助病原体的抗原物质在体内被免疫细胞识别而激发免疫反应，达到免疫个体不被传染性病原体感染的目的。但是，机体免疫力过强，也会产生副作用，如自身免疫疾病等。所以在外来抗原物质入侵时，机体会利用一整套免疫调节机制平衡免疫反应。人为的抑制免疫反应是用于治疗自身免疫疾病的手段之一。

T 细胞免疫抑制是机体免疫功能的一个重要环节，比如：限制自身免疫疾病发生和机能性下调免疫反应。T 细胞可以通过无共刺激分子存在情况下、通过 T 细胞为 APC 细胞刺激下或最近证明的胸腺来源的 CD4⁺CD25⁺ 细胞与新生 T 细胞相互作用来实现其免疫抑制功能。多数自身免疫疾病均存在特异性的抗原受体，如系统红斑狼疮患者血液中，临床检查发现存在着抗 DNA 抗体，这种抗体与抗原形成了免疫复合物，沉淀在组织中引起周期性的炎症。又如在类风湿病(RA)患者的关节组织中，含有自身免疫反应性 T-细胞，它能与某种未知抗原发生反应，这类 T 细胞通过 T 细胞抗原受体(TCRs)不仅可识别特定的抗原，也可识别主要组织相容性分子(MHC)。

因此，自身免疫反应的抗原受体通过早期识别，引发炎症，导致临床上系统红斑狼疮，类风湿关节炎等严重的自身免疫性疾病。

实验研究已确定了某些自身免疫疾病的抗原受体，如小鼠和大鼠动物模型中发生的 NEB/NEW 小鼠的红斑狼疮，实验性接种髓磷脂碱性蛋白 (MBP)，过敏性脑脊髓炎 (EAE)。

在小鼠红斑狼疮中，采用抗特异性抗体 (anti-Ids) 去除产生自身免疫反应的 B 细胞，达到治疗的目的，部分临床病例表明抗特异性抗体能明显缓解病症，但有些病例表明抗特异性抗体使病情恶化。同样在脑脊髓炎的治疗中，利用免疫 TCR-衍生肽类对抗自身免疫反应的 TCRs，结果有些病情得到了缓解，有些病情则进一步恶化。

因此，利用免疫接种来治疗某些自身免疫疾病时，病人的免疫反应直接影响治疗的临床效果。若免疫接种导致产生抗体反应并形成抗 Ids 抗体，这些抗 Ids 可能会结合自身免疫反应中的 B 细胞或 T 细胞，引起体外调节性的溶解反应，达到临床上病情缓解的效果，相反，如果免疫反应导致体内清除抗-Ids，免疫反应物就会和自身免疫反应中的 B-细胞或 T-细胞结合，同时又交叉性地与它们的抗原受体结合，进一步激发免疫细胞产生更多的自身免疫反应抗体 (Abs) 或 T-细胞，使临床病情恶化。免疫接种激发和激活的大多数 T-细胞，会同时引起不同类型的辅助 T-细胞，如 TH1 或 TH2 反应，可能会使原潜在自身免疫疾病病情恶化，或使病情缓解。因此，有效地治疗自身免疫疾病的免疫学方法尚需深入研究。

目前，在临床上通常使用的免疫抑制剂包括化学药品和抗体，其中，化学药品有普乐可复 (FK506)，环孢素 A (CsA)，骁悉 (MMF)，硫唑嘌呤 (Aza)，强的松 (Pred)，早基强的松龙 (MP) 等；抗体有抗淋巴细胞球蛋白 (ALG)，抗 CD4 单克隆抗体 (OKT4) 等。但以上的免疫抑制剂都有其毒副作用，若使用不当，一方面可因过度抑制机体免疫反应性而引发多种并发症，另一方面也可因其自身的毒副作用导致器官功能衰竭。

发明公开

本发明的目的是提供一种有选择性地抑制 T 细胞免疫反应的抑制剂。

本发明所提供的 T 细胞免疫反应抑制剂，包括针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原；或包括针对病原体的核酸疫苗和该核

酸疫苗所表达的蛋白质抗原的活性多肽；或包括灭活病原体和针对该病原体的核酸疫苗。

当所述 T 细胞免疫反应抑制剂包括独立包装或混合的针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原时，所述 T 细胞免疫反应抑制剂
5 中针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原的质量比值可为 2: 1 至 10:1，优选为 5: 1。

当所述 T 细胞免疫反应抑制剂包括独立包装或混合的针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原的活性多肽时，所述 T 细胞免疫反应抑制剂中针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原
10 的活性多肽的质量比值为 1: 5 至 5: 1。

当所述 T 细胞免疫反应抑制剂包括独立包装或混合的灭活病原体和针对该病原体的核酸疫苗时，所述 T 细胞免疫反应抑制剂中灭活病原体和针对该病原体的核酸疫苗的质量比值为 1: 2 至 1: 10。

所述 T 细胞免疫反应抑制剂还可包括免疫佐剂，如矿物油（注射用白
15 油）。

所述核酸疫苗为含有蛋白质抗原编码基因的真核细胞表达载体。

所述真核细胞表达载体中，调控蛋白质抗原编码基因表达的启动子可为 RSV（肉瘤病毒）、CMV（巨细胞病毒）和 SV40 病毒的启动子。

所述真核细胞表达载体可为质粒表达载体、病毒或噬菌体表达载体、
20 质粒 DNA 与病毒或噬菌体 DNA 组成的表达载体、质粒 DNA 与染色体 DNA 片段组成的表达载体等基因工程领域中常用的表达载体。

所述蛋白质抗原编码基因的 DNA 可以是人工合成的或者通过从微生物、真核及植物细胞或组织提取而来的双链 DNA。

所述蛋白质抗原为人工合成的或者通过生物体生产的蛋白质。

25 所述蛋白质抗原的活性多肽为人工合成的或者通过生物体生产的。

所述生物体为在人工培养条件下可用于生产放大的大肠杆菌或芽孢杆菌或酵母菌或其它真核细胞生物。

所述灭活病原体是通过生物体分离和生产的病毒、病原菌、寄生虫及过敏物质经公知的方法灭活后而得到的无感染性病原体。

30 所述灭活病原体可直接与核酸疫苗混合或灭活病原体经与矿物油（注

射用白油) 乳化后再与核酸疫苗混合。

所述 T 细胞免疫反应抑制剂可通过注射、喷射、口服、滴鼻、滴眼、渗透、吸收、物理或化学介导的方法导入机体如肌肉、皮内、皮下、静脉、粘膜组织; 或是被其他物质混合或包裹后导入机体。

5 附图说明

图1为PCR扩增的FMDV VP1基因的1%琼脂糖凝胶电泳图谱

图2为对重组表达载体SuperY/VP1进行酶切鉴定的电泳图谱

图 3 为 VP1 基因表达产物的 SDS-PAGE 图谱

图 4 为 Western-blot 实验检测 VP1 蛋白的表达图谱

10 图 5 为检测 pcD-VP1 与 146S 抗原混合后性质变化情况

图 6 为 T 细胞免疫反应抑制剂免疫小鼠后产生抗体情况的 ELISA 检测结果

图 7a 为针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原组成的 T 细胞免疫反应抑制剂对免疫小鼠 T 细胞特异性扩增的影响。

15 图7b为灭活病原体疫苗和针对该病原体的核酸疫苗组成的T细胞免疫反应抑制剂对免疫小鼠T细胞特异性扩增的影响

图8为灭活病原体疫苗和针对该病原体的核酸疫苗组成的T细胞免疫反应抑制剂共同免疫同一部位或单独免疫不同部位对免疫小鼠T细胞特异性扩增的影响

20 图 9 为 pcD-S2 和重组乙肝表面抗原 S 蛋白 T 细胞免疫反应抑制剂对免疫小鼠 T 细胞特异性扩增的影响

图10为T细胞活性抑制的量效关系柱状图

图 11 为比较 T 细胞免疫反应抑制剂对免疫小鼠白细胞介素水平的影响

25 实施发明的最佳方式

下述实施例中所提到的实验方法如无特别说明, 均为常规方法; 所提到的百分含量如无特别说明均为质量百分含量。

DNA 的制备

一种方法是将动物组织低温后粉碎, 在苯酚氯仿溶液中去掉蛋白质,

30 双链 DNA 经乙醇沉淀而分离出来。

另一种方法是从植物组织中采用 CTAB 法提取 DNA, 在苯酚氯仿溶液中去掉蛋白质, 双链 DNA 经乙醇沉淀而分离出来。

另一种方法是从大肠杆菌中提取质粒 DNA, 在苯酚氯仿溶液中去掉蛋白质, 双链 DNA 经乙醇沉淀而分离出来。

- 5 以上提取方法和技术的详细描叙可在 Sambrook 等人的“Molecular Cloning” (第二版 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 纽约) 和厉朝龙等编, 《生物化学与分子生物学实验技术》浙江大学出版社查寻。

蛋白质和多肽的制备

- 10 蛋白质和多肽可以通过标准的自动多肽合成仪 (如 ABI, 433A 等) 合成, 合成方法按仪器制造商使用方法; 或从动物组织和细胞、植物组织和细胞或微生物中, 按常规的蛋白质化学方法进行提取, 也可以从基因工程表达菌或细胞中提取。这些多肽提取方法都是公知的, 在 Doonan 的 “Protein Purification Protocols” (1996, Humana Press, NJ) 中有详细描叙。

- 15 病原物的制备及灭活

病原体通过生物体分离和生产的病毒、菌、支原体、寄生虫及过敏物质经公知的灭活方法和试剂如: 甲醛或福尔马林、 β -丙内酯、N-乙酰乙烯亚胺以及二乙烯亚胺等, 灭活后而得到的无感染性病原体, 再经分离纯化后而制成。

20

实施例 1、牛口蹄疫 (FMDV) VP1 蛋白质抗原的制备

一、牛口蹄疫 VP1 的 cDNA 克隆

- 25 感染牛口蹄疫病毒的口腔病变组织, 利用 RNA 提取试剂盒 (购自上海生物工程公司) 采用异硫氰酸胍一步法按照试剂盒的说明提取病毒总 RNA, 具体步骤如下: 取病变组织破碎分离细胞, 加入 0.5mL 异硫氰酸胍溶液, 0.5mL 的苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 溶液, 4℃ 12000rpm 离心 5 分钟, 将上清液移至一新的 1.5 毫升塑料离心管中, 加等量的异丙醇, -20℃ 放置 30 分钟, 12000rpm 离心 10 分钟, 弃去上清液, 沉淀用 70% 乙醇清洗, 沉淀干燥后溶于 30 μ L DEPC 处理水中, 变性琼脂糖凝胶电泳检测
- 30 结果表明得到病毒 RNA。

在如下反应条件下合成第一链 cDNA: 2 μ g 牛口蹄疫病毒 RNA, 50mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 75mmol/L KCl, 10 mmol/L DTT, 3mmol/L $MgCl_2$, 500 μ mol/L dNTPs, 100 μ g 随机六聚体引物, 500 单位 MMLV 反转录酶, 总体积 20 μ L, 37°C 保温 1h。以第一链 cDNA 产物为模板, 在引物 1: 5' -AAG
5 AATTCGGAGGTACCACCTCTGCGGGTGAG-3' ; 和引物 2:
5' -AATCTAGACCTCCGGAACCCAGAAGCTGTTTTGCGGG-3' , (在引物 1 和引物 2, 分别引入 *EcoRI* 识别位点和 *XbaI* 识别位点) 的引导下 PCR 扩增牛口蹄疫病毒 VP1 的 cDNA。反应体系: 5 μ L 第一链 cDNA 产物, 引物 1 和引物 2 各 10pmol, 500mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH8.4), 1.5mM $MgCl_2$, 100 μ g/mL
10 BSA, 1mM dNTPs, 2.5U Taq DNA 聚合酶, 总体积为 50 μ L。反应条件为: 94°C 变性 30 秒, 54°C 复性 30 秒, 72°C 延伸 1 分钟, 共 30 个循环。PCR 扩增的 FMDV VP1 基因的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示 (泳道 M 为 DNA Marker; 泳道 1 为 PCR 产物), 图中箭头所指为目的条带的位置, 表明目的片段的大小为 639bp, 与 VP1 基因片段大小一致, 用低熔点胶回收
15 该扩增片段。

二、表达载体 SuperY/VP1 的构建与鉴定

用限制性内切酶 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切步骤一获得的口蹄疫 VP1 cDNA 片段, 电泳, 回收后, 将 VP1 基因片段克隆入穿梭质粒 SuperY (在购自美国 Invitrogen 公司的质粒 pGAPZa 的 *SphI* 和 *HpaI* 位点上加入卡那霉素抗性
20 基因 (Kan^r) 得到 SuperY) 的 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切位点之间, 再用 *EcoRI* 和 *XbaI* 限制性内切酶对重组载体进行酶切鉴定, 将酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 检测结果如图 2 所示 (泳道 M 为 DNA Marker; 泳道 1 为酶切产物), 其中的小片段大小为 639bp, 与 VP1 基因片段大小一致, 表明
25 VP1 已正确克隆至 SuperY 上, 并将该重组载体命名为 SuperY/VP1, 然后将 SuperY/VP1 转化大肠杆菌 Top10 F' 感受态细胞, 筛选鉴定阳性克隆, 对阳性克隆进行序列分析, 结果表明扩增产物的核苷酸序列与 VP1 基因一致, 并已成功克隆至 SuperY 质粒中。

三、VP1 基因在酵母中的表达及其表达产物的检测

将步骤二构建的重组表达载体 SuperY/VP1 采用电击法转化酵母
30 SMD1168, 筛选鉴定阳性克隆, 挑取单菌落 30°C 摇瓶培养 48-96 小时后 (同

时设酵母 SMD1168 和转化有 SuperY 的酵母 SMD1168 为对照), 取上清变性后进行 SDS-PAGE 电泳, 经考马斯亮蓝 G250 染色后, 用凝胶成像系统照相, 结果如图 3 所示(泳道 1: 酵母 SMD1168 上清; 泳道 2: 转化有 SuperY 的酵母 SMD1168 的表达上清; 泳道 3: 转化有 SuperY/VP1 的酵母 SMD1168 表达上清; 泳道 M: 低分子量蛋白标准), 由泳道 3 可知 VP1 的表达产物为两种, 分子量分别为 66kD 和 43kD, 表明 SuperY/VP1 中的 VP1 基因在酵母细胞中获得表达。再将该重组表达载体 SuperY/VP1 的表达产物进行 Western blotting 分析, 具体方法为: 将表达的蛋白变性后, 用 SDS-PAGE 分离蛋白质, 再将其电转移至 NC 膜, 用 5%脱脂牛奶作封闭剂, 然后依次用牛抗口蹄疫病毒高免血清(购于新疆建设兵团兽医总站)、羊抗牛 IgG-HRP 酶标抗体(美国 Sigma 公司购买处)孵育, 最后在 DAB/H₂O₂下显色, 结果如图 4 所示(泳道 M: 低分子量蛋白标准; 泳道 1: 转化有 SuperY/VP1 的酵母 SMD1168 表达上清; 泳道 3: 酵母 SMD1168 上清; 泳道 4: 转化有 SuperY 的酵母 SMD1168 的表达上清), 泳道 1 在 66kD 和 43kD 附近出现了特异性的显色带, 而泳道 2 和 3 均未出现条带, 表明表达的蛋白能与抗 FMDV 血清反应产生特异性反应带, 表达的蛋白产物具有 FMDV 的免疫原性。表达的上清经脱盐纯化后保存在-20℃, 可作为牛口蹄疫 VP1 蛋白疫苗, 用于以下实施例。

20 实施例2、测定针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原组合物性质实验

用限制性内切酶EcoR I和Xba I酶切实施例1中的步骤一获得的口蹄疫 VP1 cDNA片段, 回收VP1基因, 将真核表达质粒pcDNA3同样以EcoR I和Xba I酶切, 用T₄ DNA连接酶将VP1基因片段连接到pcDNA3(购自Invitrogen公司)上, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在平板上筛选具有氨苄青霉素 (50 μ g/mL) 抗性的菌落, 提取质粒, 酶切筛选鉴定正确克隆, 得到含有 VP1基因的重组质粒pcD-VP1。

为证明针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原在混合后各自无性质上的改变, 将等质量的 pcD-VP1 与 146S 抗原(去除牛口蹄疫 0 型灭活疫苗(购自兰州兽医研究所)中的矿物油, 得到 146S 抗原)混合后置于 37℃ 孵育 24 小时, 经 1%琼脂糖电泳, 比较变化情况。结果如

图 5 所示, 表明 pcD-VP1 与 146S 抗原混合前后性质无变化。图中, 泳道 1 和 2 是混合前的 pcD-VP1, 3 和 4 是混合的 pcD-VP1 与 146s 的样品电泳后的情况, 泳道 5、6 是混合的 pcD-VP1 和 146s 的样品经 37°C 孵育 24 小时后的情况, 泳道 7、8 是混合的 pcD-VP1 和 146s 的样品并加入 10 单位 DNA 酶 I (Sigma 公司) 经 37°C 孵育 24 小时后的情况, 9 是 DNA Marker。

实施例 3、T 细胞免疫反应抑制剂免疫小鼠后产生抗体情况的 ELISA 检测

为验证由针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原组成的 T 细胞免疫反应抑制剂、由灭活病原体 and 针对该病原体的核酸疫苗组成的 T 细胞免疫反应抑制剂免疫小鼠后对免疫系统中抗体免疫水平的影响, 进行以下动物实验:

将 54 只 6-8 周龄 BALB/c(H-2^d) 雌性小鼠分为 9 组, 每组 6 只。第一组肌肉注射含 20 微克牛口蹄疫 0 型灭活疫苗(购自兰州兽医研究所)100 微升, 第 14 天再以相同注射剂量加强免疫一次; 第二组肌肉注射含 20 微克 VP1 蛋白的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升, 第 14 天再以相同注射剂量加强免疫一次; 第三组肌肉注射含 100 微克 pcD-VP1 的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升, 第 14 天再以相同注射剂量加强免疫一次; 第四组第一次肌肉注射含 100 微克 pcD-VP1 的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升, 在第一次免疫后第 14 天注射含 20 微克牛口蹄疫 0 型灭活疫苗 100 微升; 第五组第一次肌肉注射含 20 微克牛口蹄疫 0 型灭活疫苗 100 微升, 在第一次免疫后第 14 天注射含 100 微克 pcD-VP1 的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升; 第六组第一次肌肉注射含 100 微克 pcD-VP1 的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升, 在第一次免疫后第 14 天注射含 20 微克 VP1 蛋白的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升; 第七组第一次肌肉注射含 20 微克 VP1 蛋白的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升, 在第一次免疫后第 14 天注射含 100 微克 pcD-VP1 的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升; 第八组第一次肌肉注射含 100 微克 pcD-VP1 和 20 微克 VP1 蛋白的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升, 第 14 天再以相同注射剂量加强免疫一次; 第九组第一次肌肉注射含 100 微克 pcD-VP1 和含 20 微克牛口蹄疫 0 型灭活疫苗的混合溶液 100 微升, 第 14 天再以相同注射剂量加强免疫一次。在第二次免疫后第 15、35、50 和 72 天取血清用 ELISA 法测定其抗体滴度, 检测

方法为：将 96 孔酶标板用 8ug/ml 抗原包被，4℃过夜，3%小牛血清 37℃封闭 1 h；PBST (0.05% Tween20 溶于 PBS) 洗涤 3 次，每次 5 分钟；加入不低于系列稀释的免疫动物（小鼠）血清，以未免疫的小鼠血清作对照，37℃孵育 2 小时；PBST 洗板三次后，每孔辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG (二抗, Sigma, St. Louis) 100μl, 37℃孵育 1 小时后弃去，PBST 洗涤 3 次，每次 5 分钟；PBST 洗三次，加入底物 TMB 液 100μl，室温显色反应 30 分钟，2M 硫酸中止反应，用酶标仪测定 OD_{450/620} 光密度值，实验孔的 OD 值达到对照孔 OD 值的两倍时认为是阳性。结果如图 6 所示，表明由核酸疫苗 pcD-VP1 和 pcD-VP1 所表达的蛋白质抗原 VP1 组成的 T 细胞免疫反应抑制剂、由牛口蹄疫 0 型灭活疫苗和 pcD-VP1 组成的 T 细胞免疫反应抑制剂免疫小鼠时，特异性抗体水平与其它组比较无明显变化。说明针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原组成的 T 细胞免疫反应抑制剂、由灭活病原体 and 针对该病原体的核酸疫苗组成的 T 细胞免疫反应抑制剂免疫动物，在激活特异性抗体水平是无特别变化。图 6 中，每组从左至右依次为第二次免疫后第 15、35、50 和 72 天血清的 ELISA 结果。（图 6 中的横坐标具体表示免疫组）

实施例 4、针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原组成的 T 细胞免疫反应抑制剂对免疫小鼠 T 细胞特异性扩增的影响

将 30 只 6-8 周龄 BALB/c (H-2d) 雌性小鼠均分三组，第一组肌肉注射含 20 微克 VP1 蛋白的 0.9%NaCl 水溶液 100 微升；第二组肌肉注射含 100 微克核酸疫苗 pcD-VP1 的 0.9%NaCl 水溶液 100 微升；第三组肌肉注射含 100 微克核酸疫苗 pcD-VP1 和 20 微克 VP1 蛋白的 0.9%NaCl 水溶液 100 微升。第一次免疫后第 14 天再以同等剂量加强免疫一次，并于第二次免疫后第 14 天取脾脏 T 细胞测定其 T 细胞扩增活性，具体方法为：在无菌条件下，取脾制成单个细胞悬液，用红细胞裂解液去除红细胞，然后用 PBS 液洗三次，离心并进行细胞计数，调整细胞浓度到 1×10^6 个/ml，将每组细胞悬液分 4 份加入 96 孔培养板中。其中一份加入 100μl Con A（有丝分裂原）至终浓度为 5μg/ml，一份加入相应的特异性抗原（VP1）作为刺激物至终浓度为 2μg/ml，一份不加刺激物，一份加入 100μl BSA 至终浓度为 2μg/ml 作为无关抗原，24 小时后，每孔加入 100μl MTT 至终浓度为 5mg/ml，

48h 后, 每孔加入 100 μ l SDS-DMSO(20% SDS 溶于 50% DMSO, pH2.0), 使其完全溶解, 孵育 4h 后, 在酶标仪上读取 570nm 处的 OD 值, 计算刺激指数 (SI=实验刺激数 \div 非刺激数)。结果如图 7a 所示, 表明含有核酸疫苗 pcD-VP1 和 VP1 的 T 细胞免疫反应抑制剂免疫动物, 其 T 细胞扩增活性
5 明显低于核酸疫苗组和 VP1 组, 说明含有核酸疫苗 pcD-VP1 和 VP1 的 T 细胞免疫反应抑制剂可以特异性的降低 T 细胞免疫水平。图 7a 中, ConA 表示阳性对照; BSA 表示阴性对照, VP1 表示第一组, pcD-VP1 表示第二组; VP1+pcD-VP1 表示第三组。

实施例5、灭活病原体疫苗和针对该病原体的核酸疫苗组成的T细胞免疫反应抑制剂对免疫小鼠T细胞特异性扩增的影响
10

将50只6-8周龄BALB/c(H-2d)雌性小鼠均分五组, 第一组肌肉注射含100微克核酸疫苗 pcD-VP1和20微克146S抗原(去油的牛口蹄疫0型灭活疫苗, 购自兰州兽医研究所)的0.9%NaCl水溶液100微升; 第二组肌肉注射含100微克核酸疫苗 pcD-VP1和20微克牛口蹄疫0型灭活疫苗(购自兰州兽医研究所)的混合溶液100微升; 第三组肌肉注射含20微克牛口蹄疫0型灭活疫苗100微升; 第四组肌肉注射含100微克核酸疫苗 pcD-VP1的0.9%NaCl水溶液100微升; 第五组肌肉注射含100微克核酸疫苗 pcD-VP1和含20微克猪生殖呼吸综合症病毒(PRRSV)灭活病毒疫苗(购自哈尔滨兽医研究所)的混合溶液100微升。第一次免疫后第14天再以同等剂量加强免疫
15 一次, 并于第二次免疫后第14天取脾脏T细胞测定其T细胞扩增活性, 具体方法为: 在无菌条件下, 取脾制成单个细胞悬液, 用红细胞裂解液去除红细胞, 然后用PBS液洗三次, 离心并进行细胞计数, 调整细胞浓度到 1×10^6 个/ml, 将每组细胞悬液分4份加入96孔培养板中。其中一份加入100 μ l Con A(有丝分裂原)至终浓度为5 μ g/ml, 一份加入相应的特异性抗原(146S
20 抗原)作为刺激物至终浓度为2 μ g/ml, 一份不加刺激物, 一份加入100 μ l BSA至终浓度为2 μ g/ml作为无关抗原, 24 小时后, 每孔加入100 μ l MTT至终浓度为5mg/ml, 48h后, 每孔加入100 μ l SDS-DMSO(20% SDS溶于50%DMSO, pH2.0), 使其完全溶解, 孵育4h后, 在酶标仪上读取570nm处的OD值, 计算刺激指数 (SI=实验刺激数 \div 非刺激数)。结果如图 7b所示, 表明含
25 有核酸疫苗 pcD-VP1和20微克牛口蹄疫0型灭活疫苗的T细胞免疫反应抑
30

制剂和含有pcD-VP1核酸疫苗和146S抗原的T细胞免疫反应抑制剂免疫动物，其T细胞扩增活性明显低于核酸疫苗组或牛口蹄疫0型灭活疫苗组以及核酸疫苗pcD-VP1和灭活猪生殖呼吸综合症病毒疫苗组。说明其抑制T细胞扩增活性是抗原专一性的。图7b中，1，为ConA表示阳性对照；2，为BSA非特异性抗原组；3，为pcD-VP1核酸疫苗和146S抗原疫苗共同免疫组；4，为pcD-VP1核酸疫苗和牛口蹄疫0型灭活疫苗共同免疫组；5，为牛口蹄疫0型灭活疫苗组；6，为核酸疫苗pcD-VP1免疫组；7，为pcD-VP1核酸疫苗和灭活猪生殖呼吸综合症病毒疫苗共同免疫组。

实施例6、灭活病原体疫苗和针对该病原体的核酸疫苗组成的T细胞免疫反应抑制剂共同免疫同一部位或单独免疫不同部位对免疫小鼠T细胞特异性扩增的影响

灭活病原体疫苗和针对该病原体的核酸疫苗组成的T细胞免疫反应抑制剂对免疫小鼠T细胞特异性扩增的影响

将60只6-8周龄BALB/c(H-2d)雌性小鼠均分为六组，第一组肌肉注射含100微克核酸疫苗 pcD-VP1和20微克146S抗原(除去油的牛口蹄疫0型灭活疫苗抗原)的0.9%NaCl水溶液组合物100微升；第二组在左腿肌肉注射含20微克牛口蹄疫0型灭活疫苗的0.9%NaCl水溶液50微升，右腿肌肉注射含100微克核酸疫苗 pcD-VP1的0.9%NaCl水溶液50微升；第三组肌肉注射含100微克核酸疫苗 pcD-VP1和20微克牛口蹄疫0型灭活疫苗的0.9%NaCl水溶液100微升；第四组肌肉注射含20微克牛口蹄疫0型灭活疫苗100微升；第五组肌肉注射含100微克核酸疫苗 pcD-VP1的0.9%NaCl水溶液100微升；第六组肌肉注射含100微克核酸疫苗 pcD-VP1和含20微克猪生殖呼吸综合症病毒(PRRSV)灭活病毒疫苗(购自哈尔滨兽医研究所)的0.9%NaCl水溶液100微升。第一次免疫后第14天再以同等剂量加强免疫一次，并于第二次免疫后第14天取脾脏T细胞测定其T细胞扩增活性，具体方法同实施例5。结果如图8所示，表明不管T细胞免疫反应抑制中是否有油佐剂，含有核酸疫苗 pcD-VP1和口蹄疫146S抗原的T细胞免疫反应抑制剂免疫动物，其T细胞扩增活性明显低于核酸疫苗组或牛口蹄疫0型灭活疫苗组以及核酸疫苗pcD-VP1和灭活猪生殖呼吸综合症病毒疫苗组。说明此抑制T细胞扩增活性是抗原专一性的，同时还证明，不管是核酸疫苗 pcD-VP1和口蹄

疫146S抗原共同免疫同一部位，还是单独免疫不同部位，都能抑制T细胞活性。图8中，1，为ConA表示阳性对照；2，为BSA非特异性抗原组；3，为pcD-VP1核酸疫苗和146S抗原共同免疫组；4，为左腿肌肉注射146S抗原，右腿肌肉注射pcD-VP1核酸疫苗组；5，为pcD-VP1核酸疫苗和牛口蹄疫0型灭活疫苗共同免疫组；6，为牛口蹄疫0型灭活疫苗免疫组；7，为核酸疫苗pcD-VP1免疫组；8，为pcD-VP1核酸疫苗和灭活猪生殖呼吸综合症病毒疫苗共同免疫组。

实施例7、病原体抗原和针对该病原体抗原的核酸疫苗组成的T细胞免疫反应抑制剂对免疫小鼠T细胞特异性扩增的影响

10 pADR 质粒 (Gan RB, Cu MJ, Li ZP, et al. The complete nucleotide sequence of the cloned DNA of hepatitis B virus subtype adr in pADR-1. Sci Sin (B), 1987, 30(5): 507-521) 中含有全长的 HBV 基因组。以其为模板，在引物 1: 5' -CGGATCCATTAAGCCATGCAGTGGA ACTCC-3'；和引物 2: 5' -GTCCTTG GGTATACATTTGAACCCCGGATCCA-3'，(在引物 1 和引物 15 2，都引入 *Bam*HI 识别位点，同时在引物 1 引入起始位点 ATG，引物 2 引入终止位点 TGA) 的引导下 PCR 扩增 HBV S2 抗原的 DNA 片段。反应体系：5 μ L pADR 质粒 (10ng)，引物 1 和引物 2 各 10pmol，500mM KCl，100mM Tris-HCl (pH8.4)，1.5mM MgCl₂，100 μ g/mL BSA，1mM dNTPs，2.5U Taq DNA 聚合酶，总体积为 50 μ L。反应条件为：94℃ 变性 30 秒，54℃ 复性 30 秒，20 72℃ 延伸 1 分钟，共 30 个循环。PCR 扩增的 DNA 片段产物，用限制性内切酶 *Bam*HI 进行酶切，回收 HBV S2 抗原的 DNA 片段，将真核表达质粒 pcDNA3 同样以 *Bam*HI 酶切，用 T₄ DNA 连接酶将 S2 基因片段连接到 pcDNA3 (购自 invitrogen 公司) 上，转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，在平板上筛选具有氨苄青霉素 (50 μ g/mL) 抗性的菌落，提取质粒，酶切筛选鉴定正确 25 克隆，得到含有 S2 基因的重组质粒 pcD-S2。

将 30 只 6-8 周龄 BALB/c (H-2d) 雌性小鼠均分三组，第一组肌肉注射含有 100 微克重组乙肝表面抗原 S 基因的核酸疫苗 pcD-S2 的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升；第二组肌肉注射含有 20 微克重组乙肝表面抗原 S 蛋白 (购自于北京天坛生物制品所) 疫苗的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升；第三 30 组肌肉注射含 100 微克核酸疫苗 pcD-S2 和 20 微克重组乙肝表面抗原 S 蛋

白疫苗的 0.9%NaCl 水溶液 100 微升。第一次免疫后第 14 天再以同等剂量加强免疫一次，并于第二次免疫后第 14 天取脾脏 T 细胞测定其 T 细胞扩增活性，具体方法除刺激物为重组乙肝表面抗原 S 蛋白外，其它与实施例 5 相同。结果如图 9 所示，表明核酸疫苗 pcD-S2 和 20 微克重组乙肝表面抗原 S 蛋白疫苗 T 细胞免疫反应抑制剂免疫动物，其 T 细胞扩增活性明显低于核酸疫苗组和蛋白疫苗组。图 9 中，1 为 ConA 表示阳性对照；2 为核酸疫苗 pcD-S2 免疫组；3 为重组乙肝表面抗原 S 蛋白疫苗免疫组；4 为核酸疫苗 pcD-S2 和重组乙肝表面抗原 S 蛋白疫苗免疫组；5 为 BSA 非特异性抗原组。

10 实施例8、T细胞活性抑制的量效关系实验

将 70 只 6-8 周龄 BALB/c (H-2d) 雌性小鼠均分七组，第一组肌肉注射含 100 微克口蹄疫 VP1 基因的核酸疫苗 pcD-VP1 的 0.9%NaCl 水溶液 100 微升；第二组肌肉注射含 100 微克核酸疫苗 pcD-VP1 和 20 微克牛口蹄疫灭活病毒疫苗(购自兰州兽医研究所，含 50%注射用白油)的 0.9%NaCl 水溶液 100 微升；第三组肌肉注射含 100 微克核酸疫苗 pcD-VP1 和 20 微克口蹄疫 VP1 蛋白疫苗的 0.9%NaCl 水溶液 100 微升；第四组肌肉注射含 100 微克核酸疫苗 pcD-VP1 和 200 微克口蹄疫 VP1 蛋白中的 RGD 小肽(序列为：NH₂-LRGDLQVLAQKVARTL-COOH)疫苗的 0.9%NaCl 水溶液 100 微升；第五组肌肉注射含 100 微克核酸疫苗 pcD-VP1 和 50 微克口蹄疫 VP1 蛋白中的 RGD 小肽疫苗的 0.9%NaCl 水溶液 100 微升；第六组肌肉注射含 100 微克核酸疫苗 pcD-VP1 和 12.5 微克口蹄疫 VP1 蛋白中的 RGD 小肽的 0.9%NaCl 水溶液 100 微升；第七组肌肉注射含 100 微克核酸疫苗 pcD-VP1 和 20 微克猪瘟病毒 E2 抗原中小肽疫苗(序列为：NH₂-CTAVSPTTLRT-COOH)的 0.9%NaCl 水溶液 100 微升。第一次免疫后第 14 天再以同等剂量加强免疫一次，并于第二次免疫后第 14 天取脾脏 T 细胞测定其 T 细胞扩增活性，具体方法除刺激物为 VP1 蛋白或猪瘟 E2 小肽(第七组)外，其它与实施例 5 相同。结果如图 10 所示，表明核酸疫苗 pcD-VP1 和重组 VP1 蛋白疫苗共同免疫动物，其 T 细胞扩增活性明显低于核酸疫苗单独免疫的第二组；同时也表明核酸疫苗 pcD-VP1 和 VP1 蛋白中的 RGD 小肽疫苗在不同浓度下形成的 T 细胞免疫反应抑制剂共同免疫动物，其 T 细胞扩增活性明

显低于核酸疫苗单独免疫组，并且呈现出量效关系，既 RGD 小肽的浓度越高，T 细胞扩增活性抑制越明显。图 10 中，1，为 ConA 表示阳性对照；2，为核酸疫苗 pcD-VP1 免疫组；3，pcD-VP1 和口蹄疫灭活病毒疫苗免疫组；4，pcD-VP1 和口蹄疫 VP1 蛋白疫苗免疫组；5，为 pcD-VP1 和 200 微克口蹄疫 VP1 蛋白中的 RGD 小肽疫苗组合物免疫组；6，为 pcD-VP1 和 50 微克 RGD 小肽疫苗组合物免疫组；7，为 pcD-VP1 和 12.5 微克 RGD 小肽疫苗组合物免疫组；8，pcD-VP1 和 20 微克猪瘟 E2 抗原小肽疫苗的组合物；9，为 BSA 非特异性抗原组。

实施例 9、细胞因子水平测定

10 将 60 只 6-8 周龄 BALB/c (H-2^d) 雌性小鼠分为 10 组，每组 6 只。第一组肌肉注射含 100 微克 pcD-VP1 的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升两次，两次之间间隔 14 天；第二组肌肉注射含 20 微克牛口蹄疫 0 型灭活疫苗(购自兰州兽医研究所)100 微升两次，两次之间间隔 14 天；第三组第一次肌肉注射含 100 微克 pcD-VP1 的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升，间隔 14 天后第二次注射含 20 微克牛口蹄疫 0 型灭活疫苗 100 微升；第四组第一次肌肉注射含 20 微克牛口蹄疫 0 型灭活疫苗 100 微升，间隔 14 天后第二次注射含 100 微克 pcD-VP1 的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升；第五组肌肉注射含 100 微克 pcD-VP1 和 20 微克牛口蹄疫 0 型灭活疫苗的混合溶液 100 微升两次，两次之间间隔 14 天；第六组肌肉注射含 20 微克 VP1 蛋白的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升两次，两次之间间隔 14 天；第七组第一次肌肉注射含 20 微克 VP1 蛋白的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升，间隔 14 天后第二次注射含 100 微克 pcD-VP1 的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升；第八组第一次肌肉注射含 100 微克 pcD-VP1 的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升，间隔 14 天后第二次注射含 20 微克 VP1 蛋白的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升；第九组肌肉注射含 100 微克 pcD-VP1 和 20 微克 VP1 的 0.9% NaCl 水溶液 100 微升两次，两次之间间隔 14 天；第十组肌肉注射 0.9% NaCl 水溶液 100 微升为对照。

利用竞争定量 PCR 进行检测细胞因子 mRNA 的水平，其关键在于引入一个内标模板 pQRS，它含有 IL-2，IL-4，IL-10，IFN- γ ，HRPT 等基因的部分序列（pQRS 质粒在每个基因中加入一段 50—60bp 的核苷酸，使其基因比野生型的 IL-2，IL-4，IL-10，IFN- γ ，HRPT 等基因大。在使用

同样引物扩增后，从大小上可以判断出内标模板与野生模板的区别，同时由于是竞争的关系，所以可以判断出野生模板与内标模板量的关系。其具体制备方法见参考文献 Journal of Immunological Methods, 1993, 165:37, “Constructing polycompetitor cDNAs for quantitative PCR”），因此以 pQRS 为内标模板可以检测免疫动物中相应细胞因子的含量（金华利等在 2004 年 Vaccine 杂志第 22 卷，第 2925 页发表的文章：Effect of Chemical Adjuvants on DNA vaccination）。

取免疫后的小鼠断颈处死后取出脾脏，提取总 RNA（TRIZOL，鼎国生物公司），反转录为 cDNA，反转录依照大连宝生物公司 RNA RT-PCR 操作指南，取纯化的 1 μ g 总 RNA 置 250 μ L 离心管中，然后依次加入相关试剂：4 μ l MgCl₂，2 μ l 10 \times 缓冲液，8.5 μ l DEPC 水，2 μ l dNTP 混合物，0.5 μ l RNase inhibitor，0.5 μ l M-MLV 反转录酶（Promage 公司），0.5 μ L Oligo (dT)₁₂ 引物；反应条件为 42 $^{\circ}$ C 30min，99 $^{\circ}$ C 5min，5 $^{\circ}$ C 5min。用看家基因次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶（HPRT）为内源表达标准，将各组 cDNA 浓度调为一致，然后在 100ng 恒定量的 pQRS 管中加入 2 μ l 的 cDNA 进行 PCR 扩增。由于有 pQRS 的竞争，以下四种细胞因子 IL-2 基因，IFN- γ 基因，IL-4 基因和 IL-10 基因扩增的量将相对于 pQRS 扩增的量表现出相对不同而反映在电泳胶中的浓度差别。其中，反应所需引物和 PCR 反应条件如表 1 所示。

20

表 1. HPRT, IL-2, IFN- γ , IL-4 和 IL-10 的引物序列及 PCR 反应参数

目的基因	引物	反应条件
HPRT	5' GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG 3' GAGGGTAGGCTGGCCTATGGCT	94 $^{\circ}$ C 30 sec, 60 $^{\circ}$ C 30 sec and 72 $^{\circ}$ C 40 sec
IL-2	5' TCCACTTCAAGCTCTACAG 3' GAGTCAAATCCAGAACATGCC	94 $^{\circ}$ C 30 sec, 55 $^{\circ}$ C 30 sec and 72 $^{\circ}$ C 40 sec
IFN- γ	5' CATTGAAAGCCTAGAAAGTCTG 3' CTCATGGAATGCATCCTTTTTCG	94 $^{\circ}$ C 30 sec, 58 $^{\circ}$ C 30 sec and 72 $^{\circ}$ C 40 sec
IL-4	5' GAAAGAGACCTTGACACAGCTG 3' GAACTCTGCAGGTAATCCAGG	94 $^{\circ}$ C 30 sec, 54 $^{\circ}$ C 30 sec and 72 $^{\circ}$ C 40 sec
IL-10	5' CCAGTTTACCTGGTAGAAGTGATG	94 $^{\circ}$ C 30 sec, 56 $^{\circ}$ C 30 sec and

	3' TGTCTAGGTCCTGGAGTCCAGCAGACTCAA	72°C 40 sec
--	-----------------------------------	-------------

- 电泳检测 PCR 产物结果如图 11 所示, 表明由核酸疫苗 pcD-VP1 和 pcD-VP1 所表达的蛋白质抗原 VP1 组成的 T 细胞免疫反应抑制剂, 或由牛口蹄疫 0 型灭活疫苗 (购自兰州兽医研究所) 和 pcD-VP1 组成的 T 细胞免疫反应抑制剂免疫小鼠时 (第三, 第四, 第五, 第七, 第八和第九组), 其
- 5 动物体内的 IL-4 和 IL-10 上升, 而 IL-2 和 IFN- γ 下降。说明针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原组成的 T 细胞免疫反应抑制剂、由灭活病原体和针对该病原体的核酸疫苗组成的 T 细胞免疫反应抑制剂免疫动物, 激活了起免疫抑制活性的细胞介素 IL-4 和 IL-10 水平, 由此证明其组合物抑制 T 细胞活性是通过 IL-4 和 IL-10 完成的。图 11 中,
- 10 横坐标为第一至第十免疫组。

工业应用

本发明与现有技术相比具有以下优点：

- 1、本发明的 T 细胞免疫反应抑制剂比化学药品如：普乐可复 (FK506)，环孢素 A (CsA)，骁悉 (MMF)，硫唑嘌呤 (Aza)，强的松 (Pred)，早基强的松龙 (MP)，和抗体如：OKT4 等更为安全，有选择性的抑制机体 T 细胞免疫反应，从而可以有效的应用于自身免疫疾病、器官移植、控制 T 细胞水平的治疗等方面。
- 2、本发明的 T 细胞免疫反应抑制剂可激发机体产生正常的特异性抗体免疫反应，抑制特异性细胞免疫反应，特别是 Th1 型免疫反应；该特异性细胞免疫反应是通过增强白介素 10 水平和抑制干扰素 IFN- γ 水平介导的。增强白介素 10 水平是机体免疫系统抑制过强的免疫反应而进行的有效调节作用，是防止机体中不必要的免疫损伤而重要手段之一。所以本发明的 T 细胞免疫反应抑制剂可以特异性地用于抑制特定病原物引起的免疫损伤，能有效地克服免疫抑制方法不特异的不足。
- 3、本发明的 T 细胞免疫反应抑制剂不要求特殊的反应条件，一般生物制品药厂的设备即可生产，生产方法简单，易于工业化生产；
- 4、本发明的 T 细胞免疫反应抑制剂可用于治疗以下自身免疫疾病：系统红斑狼疮 (SLE)、类风湿关节炎 (RA)、慢性淋巴性 (桥本氏) 甲状腺炎、毒性甲状腺肿 (Grave's 病)，结节性多动脉炎、胰岛素依赖型糖尿病、重症肌无力、慢性活动性肝炎、慢性溃疡性结肠炎、恶性贫血伴慢性萎缩性胃炎、变态反应性脑脊髓膜炎、肺出血肾炎综合征、硬皮病、寻常天疱疮、类天疱疮、肾上腺皮质功能减退症、原发性胆汁性肝硬变、多发性脑脊髓硬化症、急性多发性多神经炎等严重的自身免疫性疾病；可以用于抑制器官移植中的免疫排斥反应。
- 5、本发明的 T 细胞免疫反应抑制剂可用于治疗以下由于一些常见的过敏原如尘螨、跳蚤、蟑螂、动物皮毛、花粉、霉菌、细菌、病毒及烟草烟雾导致的皮肤、呼吸道等受损害，而出现过敏反应或免疫过激而引起的过敏性免疫疾病：接触性皮炎、荨麻疹、过敏性鼻炎、哮喘、肾炎、甲状腺功能亢进、病毒性肝炎免疫超敏反应等。

权利要求

1、T细胞免疫反应抑制剂，包括针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原；或针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原的活性多肽；或灭活病原体 and 针对该病原体的核酸疫苗。

2、根据权利要求1所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述T细胞免疫反应抑制剂包括独立包装或混合的针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原。

3、根据权利要求2所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述T细胞免疫反应抑制剂中针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原的质量比值为2：1至10：1。

4、根据权利要求3所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述T细胞免疫反应抑制剂中针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原的质量比值为5：1。

5、根据权利要求1所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述T细胞免疫反应抑制剂包括独立包装或混合的针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原的活性多肽。

6、根据权利要求5所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述T细胞免疫反应抑制剂中针对病原体的核酸疫苗和该核酸疫苗所表达的蛋白质抗原的活性多肽的质量比值为1：5至5：1。

7、根据权利要求1所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述T细胞免疫反应抑制剂包括独立包装或混合的灭活病原体和针对该病原体的核酸疫苗。

8、根据权利要求7所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述T细胞免疫反应抑制剂中灭活病原体和针对该病原体的核酸疫苗的质量比值为1：2至1：10。

9、根据权利要求1-8中任一所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述T细胞免疫反应抑制剂还包括免疫佐剂。

10、根据权利要求1-8中任一所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述核酸疫苗为含有蛋白质抗原编码基因的真核细胞表达载体。

11、根据权利要求10所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述真核细胞表达载体中，调控蛋白质抗原编码基因表达的启动子为RSV、CMV和SV40病毒的启动子。

12、根据权利要求10所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述真核细胞表达载体为质粒表达载体、病毒或噬菌体表达载体、质粒DNA与病毒或噬菌体DNA组成的表达载体或质粒DNA与染色体DNA片段组成的表达载体。

13、根据权利要求10所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述蛋白质抗原编码基因的DNA是人工合成的或者通过从微生物、真核及植物细胞或组织提取而来的双链DNA。

14、根据权利要求2、3或4所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述蛋白质抗原为人工合成的或者通过生物体生产的蛋白质。

15、根据权利要求5或6所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述蛋白质抗原的活性多肽为人工合成的或者通过生物体生产的。

16、根据权利要求14所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述生物体为在人工培养条件下可用于生产放大的大肠杆菌或芽孢杆菌或酵母菌或其它真核细胞生物。

17、根据权利要求15所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述生物体为在人工培养条件下可用于生产放大的大肠杆菌或芽孢杆菌或酵母菌或其它真核细胞生物。

18、根据权利要求7或8所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述灭活病原体是通过生物体分离和生产的病毒、病原菌、寄生虫及过敏物质经公知的方法灭活后而得到的无感染性病原体。

19、根据权利要求18所述的T细胞免疫反应抑制剂，其特征在于：所述灭活病原体可直接与核酸疫苗混合或灭活病原体经与矿物油乳化后再与核酸疫苗混合。

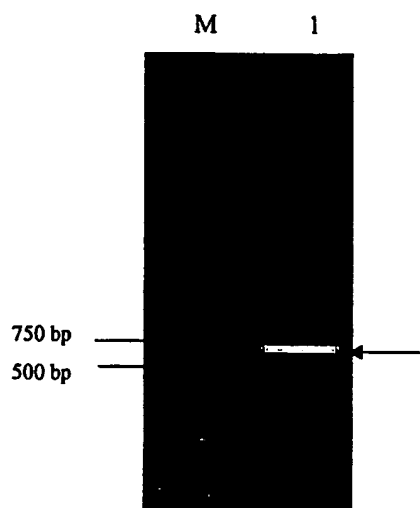


图 1

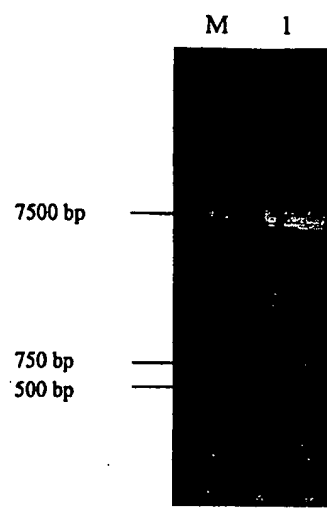


图 2

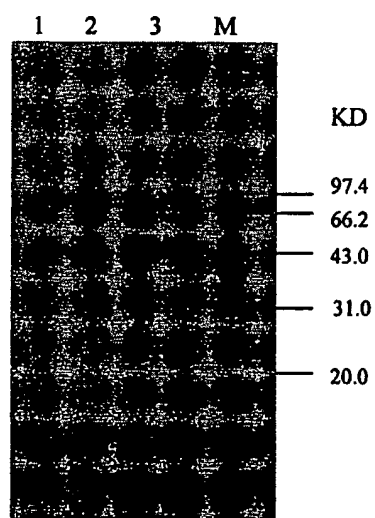


图 3

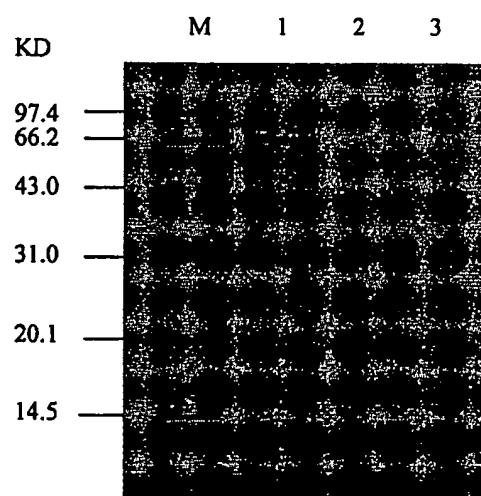


图 4

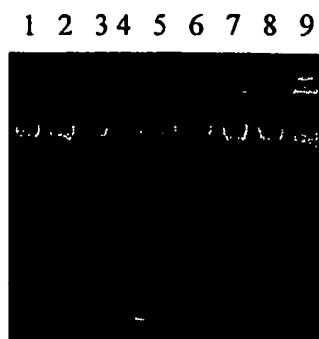


图 5

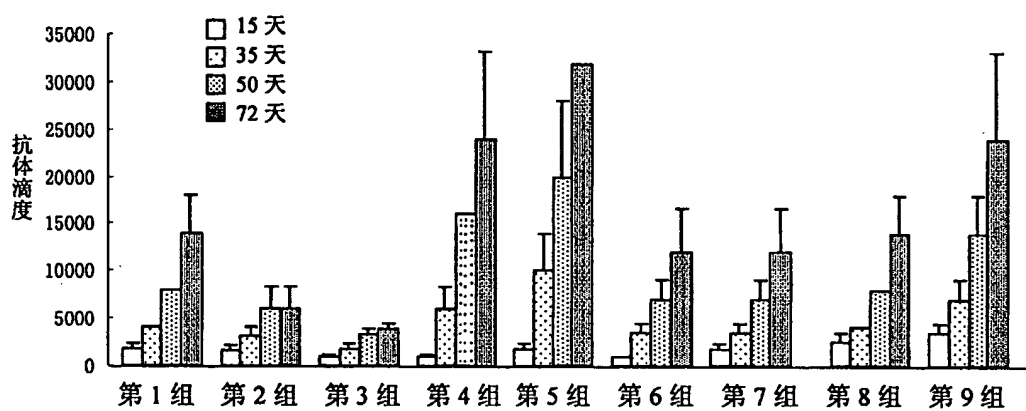


图 6

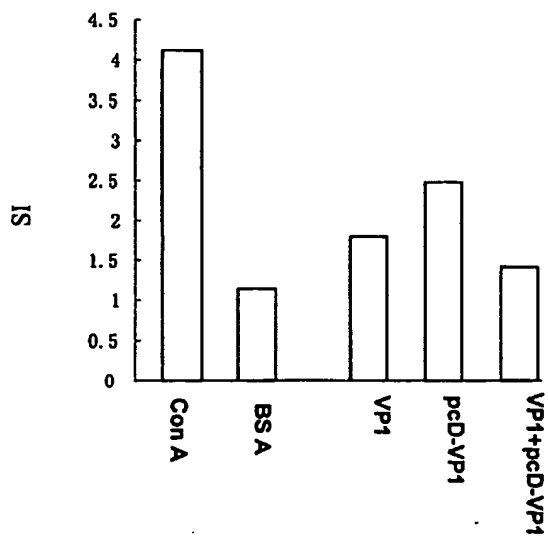


图 7a

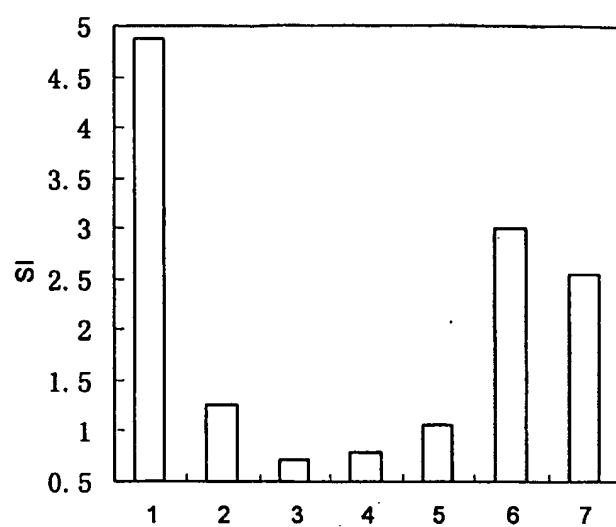


图 7b

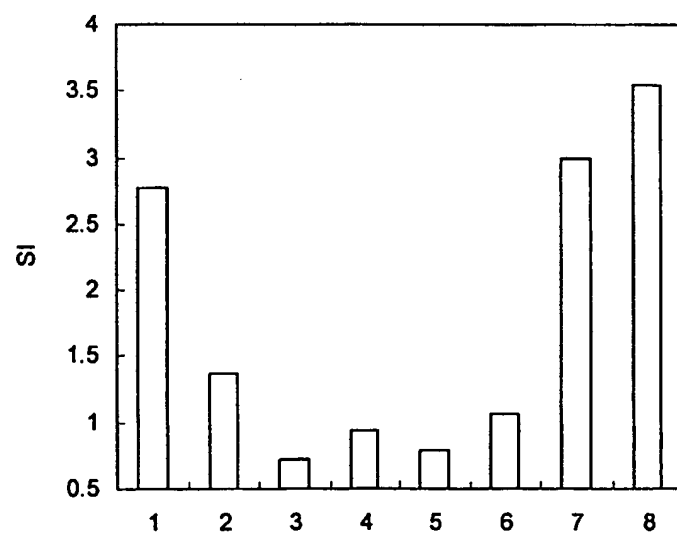


图 8

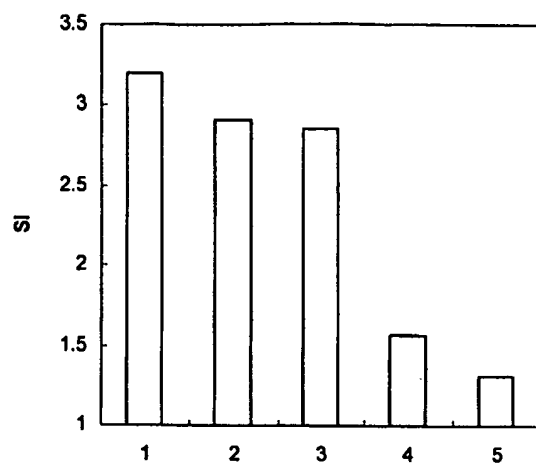


图 9

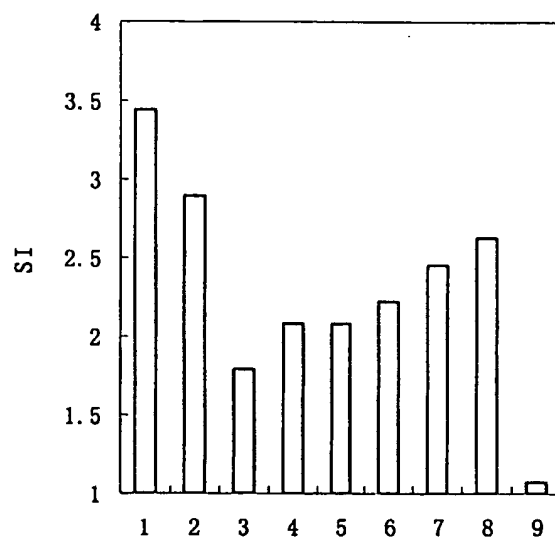


图 10

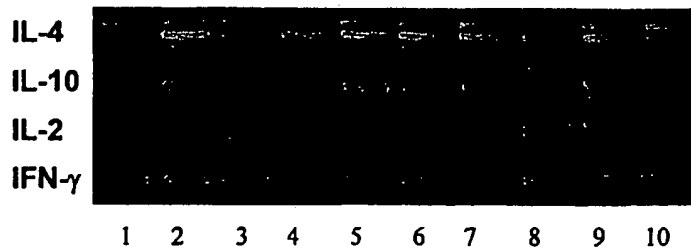


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2005/000136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷: A61K38/16 A61K39/00 A61K48/00 A61P37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷: A61K38/16 A61K39/00 A61K48/00 A61P37/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNAPT WPI EPODOC CA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Chin J Microbiol Immunol, Vol 22, No.4, July 2002, LI Wenhui et al., "Combined immunization of DNA vaccine and replication defective recombinaton adenovirus bearing rabies glycoprotein gene induces immune response against rabies virus", Page 403-406	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
19 April 2005 (19.04.2005)

Date of mailing of the international search report
19 · MAY 2005 (19 · 05 · 2005)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer
Guo Xiaoyong
Telephone No. 86-10-62085057

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2005/000136

A. 主题的分类 IPC ⁷ :A61K38/16 A61K39/00 A61K48/00 A61P37/02 按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) IPC ⁷ :A61K38/16 A61K39/00 A61K48/00 A61P37/02		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNPAT WPI EPODOC CA		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	中华微生物学和免疫学杂志, 第 22 卷, 第 4 期, 2002 年 7 月出版, 李文辉 等“狂犬病毒糖蛋白基因重组腺病毒与同一抗原核酸疫苗的联合免疫研究”, 第 403 页至第 406 页。	1-19
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 19.4 月 2005(19.04.2005)		国际检索报告邮寄日期 19.5 月 2005 (19.05.2005)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		授权官员 郭晓勇 电话号码: 86-10-62085057